

瘦露螽配子发生中一氧化氮合酶的分布

李柯^{1,2}, 奚耕思^{1*}, 苏晓红³, 阴环²

(1. 陕西师范大学生命科学学院, 西安 710062; 2. 山西师范大学生命科学学院, 山西临汾 041004; 3. 西北大学生命科学学院, 西安 710069)

摘要: 利用还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADPH)黄递酶组织化学方法, 对瘦露螽 *Phaneroptera gracilis* Burmeister 配子发生中一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)分布进行了定位研究。结果表明, 一氧化氮合酶阳性反应发生在瘦露螽精子发生中的各级生精细胞的胞质中, 成熟精子呈阴性。各级未成熟卵母细胞胞质均呈一氧化氮合酶阳性反应, 胞质着色为深蓝黑色, 核区不明显。随着卵黄颗粒的逐渐形成, 胞质中的一氧化氮合酶阳性产物逐渐减少, 直到卵黄颗粒完全形成。卵泡细胞在卵黄颗粒形成之前呈一氧化氮合酶阴性反应, 在卵黄颗粒完成后, 卵泡细胞的胞质中开始呈一氧化氮合酶阳性反应, 直至卵壳的形成。提示一氧化氮参与了瘦露螽配子发生。

关键词: 瘦露螽; 一氧化氮; 一氧化氮合酶; NADPH-黄递酶; 配子发生

中图分类号: Q965 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2005)02-0184-04

Distribution of the nitric oxide synthase during gametogenesis in *Phaneroptera gracilis* Burmeister

LI Ke^{1,2}, XI Geng-Si^{1*}, SU Xiao-Hong³, YIN Huan² (1. College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China; 2. College of Life Sciences, Shanxi Normal University, Linfen, Shanxi 041004, China; 3. College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: The distribution of nitric oxide synthase (NOS) during gametogenesis in *Phaneroptera gracilis* Burmeister was studied with NADPH-diaphorase histochemical method. The results showed that nitric oxide synthase positive reaction could be found in the cytoplasm of permatogenic cells in the different stages of the gametogenesis in *P. gracilis*, while NOS negative reaction appeared in matured sperms. There were NOS positive reactions in the cytoplasm of immatured oocytes in all stages. Usually, cytoplasm was stained with some heavy black while nuclear regions were not obvious. With the formation of yolk granules, the products of NOS positive reactions diminished gradually in cytoplasm until yolk granules formed completely. The follicle cells showed NOS negatively before the formation of yolk granules. After the yolk granules formed completely, the cytoplasm of follicle cells started showing NOS positively until the formation of chorion.

Key words: *Phaneroptera gracilis*; nitric oxide; nitric oxide synthase; NADPH-diaphorase; gametogenesis

自1987年在生物体内发现了内源性一氧化氮(nitric oxide)以来(Marletta *et al.*, 1988), 国内外学者对一氧化氮的生物学意义进行了广泛深入的研究, 证实了一氧化氮是生物体内重要的信使分子和效应分子, 在机体的生理、病理过程中发挥着极大的作用。有关研究报道甚多, 但目前对生殖系统中一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)的研究主要集中在哺乳动物, 其他类群的研究报道很少。我们采用还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADPH)黄递酶组织化学方法, 对瘦露螽 *Phaneroptera gracilis*

Burmeister (直翅目、螽斯亚目、瘦露螽总科、瘦露螽科)配子发生中一氧化氮合酶分布作了定位观察, 以研究一氧化氮在瘦露螽配子发生中的分布及其生物学功能, 为进一步掌握昆虫生殖调节机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

瘦露螽采自西安市长安县, 虫龄为成虫, 选取健

基金项目: 陕西省自然科学基金项目(2000SM22)

作者简介: 李柯, 男, 1974年生, 山西晋城人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫生理学, E-mail: liker369@hotmail.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: hsh@xjtu01.xjtu.edu.cn

收稿日期 Received: 2004-01-16; 接受日期 Accepted: 2004-06-02

壮无伤的个体作为实验对象。

1.2 方法

在生理盐水中,从所选活体材料解剖出精巢、卵巢和受精囊,立即放入 4% 多聚甲醛(0.1 mol/L, pH 7.4 磷酸盐缓冲液配制)中 4℃ 固定 6 h;移入 30% 蔗糖溶液(0.1 mol/L, pH 7.4 磷酸盐缓冲液配制)中 4℃ 至材料下沉;冰冻切片 8~10 μm ,冻台温度为 $-18^{\circ}\text{C} \sim -20^{\circ}\text{C}$;切片贴于载玻片上,晾干;经 0.1 mol/L pH 7.2~7.4 PBS(磷酸盐缓冲液生理盐水)洗净,浸入 NADPH 黄递酶孵育液[0.5 mg/mL NADPH (Sigma 产品);0.4 mg/mL NBT (氯化硝基四氮唑蓝,上海前进试剂厂产品);0.3% Triton-X100;0.1 mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液配制]中,37℃ 反应 40 min,0.01 mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液冲洗停显;切片经梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封固,镜检,拍照,记录结果。设 NADPH 空白对照,其结果为阴性。

2 结果

2.1 瘦露螽精子发生中一氧化氮合酶的表达

一氧化氮合酶阳性反应出现在瘦露螽精子发生中的各级生精细胞的胞质中。位于精巢管顶部的精原细胞胞质着色为浅蓝黑色(图版 I-1:b),由精原细胞群包围着的端胞(apical cells)呈一氧化氮合酶阳性反应(图版 I-1:a)。精原细胞后移进入生长区进行有丝分裂形成初级精母细胞,此时初级精母细胞胞质着色为浅蓝黑色(图版 I-1:c)。初级精母细胞继续后移进入成熟区之后进行 2 次减数分裂,第 1 次减数分裂形成次级精母细胞,第 2 次减数分裂形成圆形精子细胞。次级精母细胞胞质一氧化氮合酶阳性产物呈深蓝黑色条块状(图版 I-2:a),圆形精子细胞一氧化氮合酶阳性反应产物呈深蓝黑色圆点状位于精子细胞长尾部的一极(图版 I-2:b)。圆形精子细胞后移进入转化区开始分化,分化过程中各期精子细胞尾部呈一氧化氮合酶阳性(图版 I-3:箭头示;图版 I-4:箭头示)。受精囊中成熟精子呈一氧化氮合酶阴性反应(图版 I-5:a)。

2.2 瘦露螽卵子发生中一氧化氮合酶的表达

位于卵巢管最前端卵原区的卵原细胞呈一氧化氮合酶阳性反应(图版 I-6:a),卵原细胞后移进入生长期,幼期的卵母细胞还没出现卵泡细胞,此时卵母细胞胞质着色为深蓝黑色(图版 I-6:b)。随着卵母细胞的发育成熟,卵黄颗粒的开始形成(图版

I-7:b),胞质中的一氧化氮合酶阳性产物逐渐减少,直到卵黄颗粒完全形成(图版 I-7:b;图版 I-8)。卵泡细胞在卵母细胞周围出现后成单层细胞圈,在卵黄颗粒完全形成之前卵泡细胞呈一氧化氮合酶阴性反应(图版 I-7:a;图版 I-8:a),在卵黄颗粒完成后,卵泡细胞开始分泌卵壳,此时卵泡细胞胞质开始呈一氧化氮合酶阳性反应(图版 I-9:a),卵壳形成过程中,卵泡细胞胞质呈一氧化氮合酶阳性反应(图版 I-9:b)。卵壳形成的整个过程,卵壳呈一氧化氮合酶阴性反应(图版 I-9:c;图版 I-10:b),卵壳完成后的卵泡细胞退化不着色(图版 I-10:a)。受精囊腺细胞层分泌细胞呈一氧化氮合酶阳性反应(图版 I-5:b),肌肉层上有一氧化氮合酶阳性反应产物(图版 I-5:c)。

3 讨论

生物体内一氧化氮主要在一系列一氧化氮酶系催化作用下合成,由一氧化氮合酶作用于 L-Arg 中胍基氮原子末端后,随即产生出等量的 L-Cit 和一氧化氮。一氧化氮合酶在完成此氧化过程中还需要还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADPH)、黄素二核苷酸(FAD)、黄素单核苷酸(FMN)和四氢叶酸生物喋呤(BH_4)等物质参与辅助。目前已研究确定的哺乳动物一氧化氮合酶的亚型有 3 种,分别由不同的基因编码。根据各亚型纯化和 cDNA 克隆的时间先后以及原型酶的细胞或组织来源和表达方式命名, NOS I 称神经元型 NOS(neuronal NOS, nNOS), NOS II 称诱导型 NOS(inducible NOS, iNOS), NOS III 称内皮型 NOS(endothelial NOS, eNOS) (Knowles and Moncada, 1994)。NOS I 和 NOS III 在细胞处于生理状态下即有表达,又合称为结构型 NOS(constructive NOS, cNOS)。由于一氧化氮的形成需要 NADPH 作为一氧化氮合酶的协同因子参与反应,因此用 NADPH-黄递酶组织化学方法进行一氧化氮合酶的组织化学定位研究成为一种简单有效的手段(Vincent and Kimura, 1992)。已有研究证明,一氧化氮合酶就是 NADPH-黄递酶(Muller, 1994; Oparina and Mylnikov, 1996),从而确立了用固定耐受型 NADPH-黄递酶组织化学方法进行昆虫一氧化氮合酶组织化学定位的可行性。

3.1 一氧化氮合酶在瘦露螽精子发生中的表达

本研究结果显示,一氧化氮合酶阳性反应存在于成虫瘦露螽的各级生精细胞,成熟的精子为一氧化氮合酶阴性。端胞呈一氧化氮合酶阳性反应,而

精原细胞着色较浅,推测端胞分泌一氧化氮间接参与精原细胞分裂。一氧化氮合酶在次级精母细胞、精子细胞和精子中呈现了动态分布,表明一氧化氮在精子形成过程中起重要作用。昆虫的循环方式为开放式循环,组织和细胞可以直接与血液交换气体、水分和各种无机及有机化合物,育精囊壁呈一氧化氮合酶阳性反应,推测与其从血淋巴液中吸收营养供精子发生有关。

3.2 一氧化氮合酶在瘦露螽卵子发生中的表达

研究结果显示各级未成熟卵母细胞胞质均呈一氧化氮合酶强阳性反应,胞浆着色为深蓝黑色,核区不明显。随着卵黄颗粒的逐渐形成,胞质中的一氧化氮合酶阳性产物逐渐减少,卵黄颗粒完全形成时,胞质呈一氧化氮合酶阴性。表明一氧化氮参与了卵黄颗粒形成。卵泡细胞在卵黄颗粒形成之前呈一氧化氮合酶阴性,在卵黄颗粒完成后,卵泡细胞胞质中开始呈一氧化氮合酶阳性,直至卵壳的形成。卵壳完成后的卵泡细胞凋亡不着色。卵泡细胞发育过程一氧化氮合酶分布的动态变化,充分说明了一氧化氮参与了卵壳的形成。受精囊是昆虫储存精子的地方,其囊壁腺细胞分泌的液体可保藏接受精子,本项研究发现受精囊腺细胞层呈一氧化氮合酶阳性反

应,表明一氧化氮参与了腺细胞的分泌。受精囊的肌肉层的活动受神经的支配(Clark and Lange, 2001)。研究还显示瘦露螽受精囊肌肉层肌纤维间有一氧化氮合酶阳性产物,推测是肌纤维间神经元,但这一推论还有待进一步研究证实。

参 考 文 献 (References)

Clark J, Lange AB, 2001. Evidence of a neural loop involved in controlling spermathecal contractions in *Locusta migratoria*. *J. Insect Physiol.*, 47 : 607 – 616.

Knowles RG, Moncada S, 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.*, 298 (2) : 249 – 258.

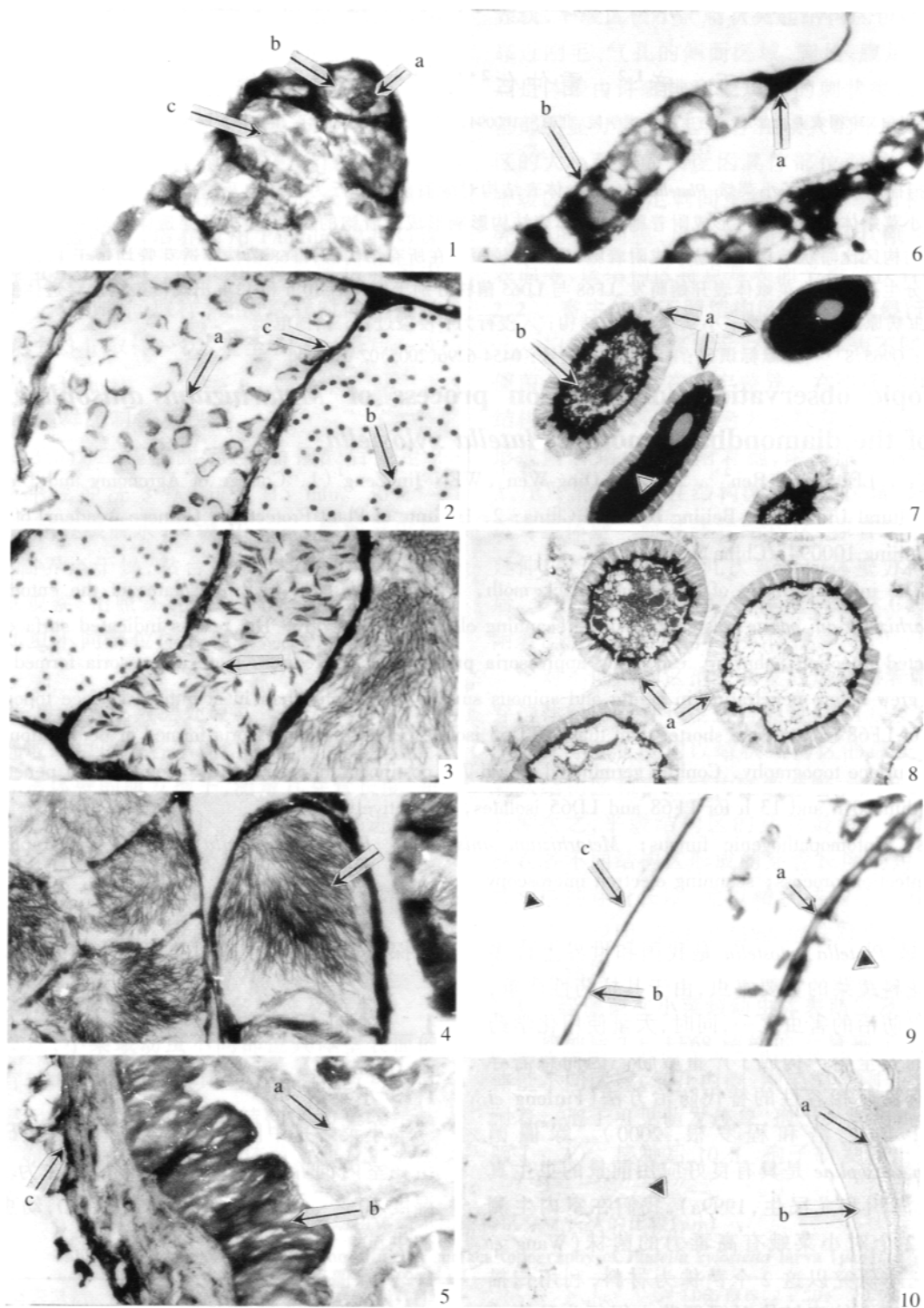
Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R, Leaf CD, Wishnok JS, 1988. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate : nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry*, 27(24) : 8 706 – 8 711.

Muller U, 1994. Ca^{2+} /calmodulin-dependent nitric oxide synthase in *Apis mellifera* and *Drosophila melanogaster*. *Eur. J. Neurosci.*, 6(8) : 1 362 – 1 370.

Oparina TI, Mylnikov SV, 1996. The effect of L-arginine on the NADPH-diaphorase activity in *Drosophila melanogaster* homogenates. *Zh. Evol. biokhim. Fiziol.*, 32(2) : 217 – 219.

Vincent SR, Kimura H, 1992. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience*, 46 (4) : 755 – 784.

(责任编辑：黄玲巧)



1. 示 NOS 阳性端细胞 Showing NOS positive apical cell (a), NOS 弱阳性精原细胞 Weak NOS positive spermatocyte I (c) (740x); 2. 示 NOS 阳性次级精母细胞 Showing NOS positive spermatocyte II (a), NOS 阳性圆形精子细胞 NOS positive rounded spermatocyte (b), NOS 阳性育精囊壁 NOS positive the wall of sperm cyst (c) (740x); 3. 4. 示 NOS 阳性分化精子细胞 NOS positive metamorphic spermatozoa (↑) (740x); 5. 受精囊横切, 示 NOS 阴性成熟精子 Transverse section of receptaculum seminis, showing NOS negative matured spermoblast (a), NOS 阳性腺细胞层 NOS positive gland cells (b), 肌纤维间 NOS 阳性产物 NOS positive products among muscle fiber (c) (370x); 6. 示 NOS 阳性卵原区 Showing NOS positive ovariole region (a), 幼期卵母细胞 Young oocytes (b) (370x); 7. 示 NOS 阴性卵泡细胞 Showing NOS negative follicle cells (a), 卵黄颗粒开始出现 Yolk granules (b), NOS 阳性卵母细胞胞质 NOS positive cytoplasm of oocyte (Δ) (184x); 8. 示卵黄颗粒形成过程中卵母细胞胞质中 NOS 阳性反应, NOS 阴性卵泡细胞 Showing NOS positive reaction in the cytoplasm of oocyte during the formation of yolk granules, NOS negative follicle cells (a) (184x); 9. 示两个不同发育时期的卵母细胞, 卵壳开始形成前 NOS 阳性卵泡细胞 Showing two oocytes in different stages, NOS positive follicle cells before the formation of chorion (a), 卵壳形成过程 NOS 阳性卵泡细胞 NOS positive follicle cells during the formation of chorion (b), NOS 阴性卵壳 NOS negative chorion (c), 阴性 NOS 卵母胞质 NOS negative the cytoplasm of oocyte (▲) (740x); 10. 示 NOS 阴性退化卵泡细胞 Showing NOS negative degenerative follicle cells (a), NOS 阴性卵壳 NOS negative chorion (b), NOS 阴性卵母细胞胞质 NOS negative the cytoplasm of oocyte (▲) (370x).